

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-508532

(43) 公表日 平成9年(1997)9月2日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 Q 1/25

7823-4B

C 1 2 Q 1/25

C 1 2 N 11/14

2121-4B

C 1 2 N 11/14

G 0 1 N 27/06

0274-2 J

G 0 1 N 27/06

A

33/545

0276-2 J

33/545

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁)

(21) 出願番号 特願平7-521309  
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)2月6日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)8月9日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US95/01605  
 (87) 国際公開番号 WO95/22057  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)8月17日  
 (31) 優先権主張番号 08/193, 972  
 (32) 優先日 1994年2月9日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 アボット・ラボラトリーズ  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500、  
 アボット・パーク、アボット・パーク・ロ  
 ード・100、チャド・0377/エイ・ピー・  
 6・デー2  
 (72) 発明者 スプリング、トーマス・ジー  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60035、ハイ  
 ランド・パーク、パーバリー・ロード・  
 234  
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物試薬固定化媒質

(57) 【要約】

本発明は、バイオ試薬を支持物質に固定化でき、乾燥すると耐水性層またはフィルムになる固定化媒質を提供する。本発明の固定化媒質は、(i) 液体または流体の結合試薬と (ii) 結合試薬中に均一分散された、固相に固定化されたバイオ試薬複合体とを含む。懸濁液にはさらに、媒質中に均一分散された補助成分を含んでおり、これらの補助成分は媒質に、電気化学的特性を付与し、固定化したバイオ試薬の安定性を高め、および/または媒質が実質的に耐水性または非水溶性の層になる能力を改善できる。本発明が提供する固定化媒質は均質な液体懸濁液の形である。本発明の固定化媒質は、固定化したバイオ試薬を使用するほぼすべての検定様式に使用できる。例えば、固定化媒質を使用して酵素電極を製造することができ、補助電極および参照電極と共に使用して、酵素の基質の生物学的変換を電気化学的に検出でき、非電気化学的手段を用いて酵素基質の生物学的変換を検出できるバイオセンサを製造することができ、当業界で公知の不均質免疫検定様式に使用できる固相を製造することができる。

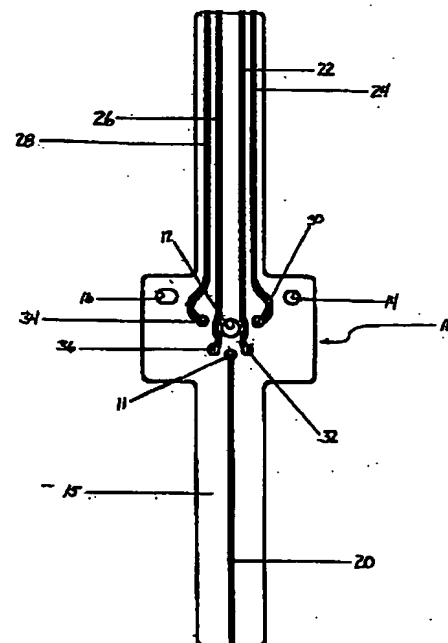


Figure 1

## 【特許請求の範囲】

1. バイオ試薬を支持物質に固定化するための固定化媒質であって、
  - a. 固相に固定化したバイオ試薬と
  - b. 前記の固定化したバイオ試薬が均一に分散されているラテックス樹脂とを含み、実質的に均質に分配可能な混合物である固定化媒質。
2. 前記バイオ試薬が分析物、分析物アナログ、検出可能部分および特異的結合相手からなる群から選択される請求項1に記載の媒質。
3. 前記バイオ試薬が酵素である請求項1に記載の媒質。
4. 前記固相が、シリカ粒子、アガロース粒子、セルロース粒子、誘導体化したセルロース粒子、炭素粒子、白金担持炭素粒子、黒鉛粒子、白金担持黒鉛粒子、酸化アルミニウム粒子、アルミノシリケート粒子、二酸化チタン粒子、白金族金属酸化物粒子、金属ポルフィリン炭素粒子、金属ポルフィリン黒鉛粒子およびそれらの混合物からなる群から選択される請求項1に記載の媒質。
5. 前記固相がさらに、四級アンモニウムポリマー、三級アミノポリマー、二級アミノポリマーおよび一級アミノポリマーからなる群から選択した吸着されたポリマーを含む請求項4に記載の媒質。
6. 固定化媒質の化学的特性および物理的特性を修飾するための手段をさらに含み、前記修飾手段が、可塑剤、濃厚剤、フィルム形成剤、安定剤、分散剤、消泡剤、電気化学的活性物質およびこれらの混合物からなる群から選択される請求項1に記載の媒質。
7. テストサンプル中に含有される分析物の生物学的変換を検出するためのデバイスであって、前記デバイスが支持物質と前記支持物質上の少なくとも1枚の耐水性固定化媒質フィルムとを含み、前記フィルムが
  - a. 固相に固定化したバイオ試薬と
  - b. 前記の固定化したバイオ試薬が均一に分散されている乾燥ラテックス樹脂を含むデバイス。
8. 前記バイオ試薬が酵素である請求項7に記載のデバイス。
9. 固定化媒質の化学的特性および物理的特性を修飾するため

の手段をさらに含み、前記修飾手段が、可塑剤、濃厚剤、フィルム形成剤、安定剤、分散剤、消泡剤、電気化学的活性物質およびこれらの混合物からなる群から選択される請求項7に記載のデバイス。

10. 前記固相が、シリカ粒子、アガロース粒子、セルロース粒子、誘導体化したセルロース粒子、炭素粒子、白金担持炭素粒子、黒鉛粒子、白金担持黒鉛粒子、酸化アルミニウム粒子、アルミノシリケート粒子、二酸化チタン粒子、白金族金属酸化物粒子、金属ポルフィリン炭素粒子、金属ポルフィリン黒鉛粒子およびそれらの混合物からなる群から選択される請求項7に記載のデバイス。

11. 前記固相がさらに、四級アンモニウムポリマー、三級アミノポリマー、二級アミノポリマーおよび一級アミノポリマーからなる群から選択した吸着されたポリマーを含む請求項10に記載のデバイス。

12. 前記支持物質が導電性物質を含む請求項7に記載のデバイス。

13. 前記支持物質が、管、磁気粒子、マイクロタイタープレート、膜、試験管、微粒子およびビーズからなる群から選択さ

れる請求項7に記載のデバイス。

14. テストサンプル中の分析物の存在または量を測定する方法であって、

a. テストサンプルを、前記テストサンプルに含まれる分析物の生物学的変換を検出できるデバイスと接触させ、前記デバイスが、支持物質と前記支持物質上の少なくとも1枚の耐水性固定化媒質フィルムとを含み、前記フィルムが

1. 固相に固定化したバイオ試薬及び

2. 前記の固定化したバイオ試薬が均一に分散されている乾燥ラテックス樹脂であるステップと、

b. 前記テストサンプル中の前記分析物の量を測定するステップとを含む方法。

15. 前記バイオ試薬が酵素である請求項14に記載の方法。

16. 前記固相が粒子であり、前記固相が、シリカ粒子、アガロース粒子、セルロース粒子、誘導体化したセルロース粒子、炭素粒子、白金担持炭素粒子、黒鉛粒子、白金担持黒鉛粒子、酸化アルミニウム粒子、アルミノシリケート粒子、二

酸化チタン粒子、白金族金属酸化物粒子、金属ポルフィリン炭素粒子、金属ポルフィリン黒鉛粒子およびそれらの混合物からなる群か

ら選択される請求項14に記載の方法。

17. 前記固相がさらに、四級アンモニウムポリマー、三級アミノポリマー、二級アミノポリマーおよび一級アミノポリマーからなる群から選択した吸着されたポリマーを含む請求項16に記載の方法。

18. 支持物質と前記支持物質上の少なくとも1枚の耐水性固定化媒質フィルムを含む捕獲試薬であって、前記フィルムが

a. 固相に固定化したバイオ試薬と

b. 前記の固定化したバイオ試薬が均一に分散されている乾燥ラテックス樹脂と

を含む捕獲試薬。

19. 前記支持物質が、ビーズ、磁気粒子、微粒子、試験管、マイクロタイタープレート、管および膜からなる群から選択される請求項18に記載の捕獲試薬。

20. 前記バイオ試薬が、分析物、分析物アナログ、検出可能部分および特異的結合相手からなる群から選択される請求項18に記載の捕獲試薬。

21. 前記固相が粒子であり、前記固相が、シリカ粒子、アガロース粒子、セルロース粒子、誘導体化したセルロース粒子、

炭素粒子、白金担持炭素粒子、黒鉛粒子、白金担持黒鉛粒子、酸化アルミニウム粒子、アルミノシリケート粒子、二酸化チタン粒子、白金族金属酸化物粒子、金属ポルフィリン炭素粒子、金属ポルフィリン黒鉛粒子およびそれらの混合物からなる群から選択される請求項18に記載の捕獲試薬。

22. 前記固相がさらに、四級アンモニウムポリマー、三級アミノポリマー、二級アミノポリマーおよび一級アミノポリマーからなる群から選択した吸着されたポリマーを含む請求項21に記載の捕獲試薬。

23. 特異的結合対の構成要素と前記分析物との間の結合をモニタリングすることによりテストサンプル中の分析物の存在または量を測定するための方法であっ

て、

a. 前記テストサンプルを捕獲試薬と接触させて、混合物を形成し、前記捕獲試薬が支持物質と前記支持物質上の少なくとも1枚の耐水性固定化媒質フィルムとを含み、前記フィルムが

1. 固相に固定化したバイオ試薬及び

2. 前記の固定化したバイオ試薬が均一に分散されている乾燥ラテックス樹脂であるステップと、

b. 前記混合物を、分析物／捕獲試薬複合体を形成するのに

十分な時間および条件下でインキュベーションするステップと、

c. 前記複合体を指示試薬と接触させるステップと、

d. 測定可能なシグナルを検出するステップとを含む方法。

24. 前記支持物質が、ビーズ、磁気粒子、微粒子、試験管、マイクロタイタープレート、管および膜からなる群から選択される請求項23に記載の方法。

25. 前記バイオ試薬が、分析物、分析物アナログ、検出可能部分および特異的結合相手からなる群から選択される請求項23に記載の方法。

26. 前記固相が粒子であり、前記固相が、シリカ粒子、アガロース粒子、セルロース粒子、誘導体化したセルロース粒子、炭素粒子、白金担持炭素粒子、黒鉛粒子、白金担持黒鉛粒子、酸化アルミニウム粒子、アルミノシリケート粒子、二酸化チタン粒子、白金族金属酸化物粒子、金属ポルフィリン炭素粒子、金属ポルフィリン黒鉛粒子およびそれらの混合物からなる群から選択される請求項23に記載の方法。

27. テストサンプル中の分析物の存在を評価するためのテスト用キットであって、

a. 支持物質と前記支持物質上の少なくとも1枚の耐水性固

定化媒質フィルムを含み、前記フィルムが

1. 固相に固定化したバイオ試薬及び

2. 前記の固定化したバイオ試薬が均一に分散されている乾燥ラテックス樹脂

脂である捕獲試薬と、

b. 検出可能なシグナルを提供できる指示試薬とを含むテスト用キット。

28. 前記支持物質が、ビーズ、磁気粒子、微粒子、試験管、マイクロタイタープレート、管および膜からなる群から選択される請求項27に記載のテスト用キット。

29. 前記バイオ試薬が、分析物、分析物アナログ、検出可能部分および特異的結合相手からなる群から選択される請求項27に記載のテスト用キット。

## 【発明の詳細な説明】

### 生物試薬固定化媒質

#### 発明の分野

本発明はバイオ試薬の固定化に係る。具体的には、本発明はバイオ試薬を固定化するための均質に分配できる懸濁液に係る。

#### 発明の背景

特異的結合対の固定化された、または固定化可能な構成要素を使用し、結合型および遊離型の標識試薬の分離を行なう、種々の結合検定が提唱されている。特に、検出すべき抗原に対する抗体を、試験管の内壁またはプラスチックビーズのような固定化物質に結合させる、この種の結合検定が多数記載されている。例えば、米国特許第4,243,749号明細書は、試験管の内壁に測定すべきハプテンに対する特異抗体を不溶化または固定化させた試験管内で反応を実施する、競合結合検定を開示している。この反応には標識したハプテン接合体を含み、試験管壁に結合する標識ハプテン接合体の量は測定対象のハプテンの量に反比例する。同様に、米国特許第4,230,683号明細書は、抗原または抗体が結合したポリスチレンビーズを

使用する方法を開示しており、この方法では、抗原または抗体がハプテンと接合したその抗原に対する抗体または抗体と反応する。結合したハプテン接合抗体はさらに標識した抗ハプテン抗体と反応し、テストサンプル中の抗原または抗体の量を測定する。

固定化した触媒活性分子、例えば酵素を結合参与体として使用して、テストサンプル中に存在する可能性のある固定化した酵素の基質の存在または量を測定する。市販の化学的分析器では多孔性表面に結合させた酵素を使用して、酵素基質を光学的または電気化学的に検出できる物質に変換する。管の内壁に酵素を固定化した管状のナイロン製フローセルを有する光学分析器が記載されている。酵素を固定化したクロマトグラフ用粒子、例えば微孔性ガラスを含むフローセルを有する光学分析器も記載されている。

固定化した酵素がその基質に作用して、電気化学的活性分子を形成する能力を

利用した電気化学的センサが記載されている。このようなセンサには、酵素電極、参照電極、対電極およびポテンシオスタット等の電流電極が含まれる。酵素電極は一般に白金でできており、その上にオキシダーゼ酵素層が載っている。

この電極を酸化可能な基質および分子状酸素を含むサンプルに浸漬すると、両方の分子が酵素層に拡散し、基質が酵素と反応し、その結果、酵素が還元される。還元された酵素は酸素分子で酸化され、酸素分子は還元されて過酸化物になる。

(参照電極によって測定した)電極電位が十分高い場合は、酵素電極の白金部分がこの過酸化物を酸化して、酸素を再生し、二つの遊離電子を産生する。この遊離電子は酵素電極から、三つの電極で構成された回路の最後の対電極に向かって流れる。回路に接続されたポテンシオスタットは電子により生成された電流を測定することができ、測定された電流はサンプル中に含まれる酸化可能な基質の量に比例する。従って、サンプル中の酸化可能な基質の存在および／または量が測定できる。

現在利用できる酵素電極を有する電流電極には、その製造面での制約がある。これらは、このような電極を製造するために使用する部品が高価であることおよび／またはその製造に使用する工程が複雑であることに起因する。

例えば、米国特許第4,987,075号明細書は、イソシアネートモノマーおよびポリウレタンポリマーを含むセルロースと結合した酵素の層を付着させた白金電極を含む酵素電極を

開示している。しかし、電流電極を完成するためには、酵素電極は別の白金電極を必要とする。

電極表面上に酵素を直接固定化することも記載されている。例えば、合成ポリマーを使用して白金表面に酵素を固定化させることが記載されており(英国特許第2,230,865号明細書)、グルコースオキシダーゼを封入したスルホン酸化ポリエステルポリマーも白金表面の被覆に使用されており(Analytic Chimica Acta, 245, 139-143(1991))、白金担持黒鉛電極上のガンマ線照射したポリビニルアルコール基材中に物理的に封入した酵素が記載されており(Biosenso



rs and Bioelectronics, 5, 47-61(1990))、シリコンウェファ上のエラストマーに酵素を混合したグルコースバイオセンサ電極が記載されており（米国特許第4,938,860号明細書）、酵素電極をシリコンウェファ上に製造できる多層マイクロ製法が記載されている（米国特許第5,200,051号明細書）。しかし、上記のように、このような電極は高価であり、大量生産に適していない。

酵素電極を製造する別な方法では、電極物質と酵素の両方を含有するマトリックスに酵素を混合する（Anal. Chem., 62,

318-320(1990))。しかし、そこに記載された方法で製造した電極は、電極を研磨して新鮮な酵素に露出することにより、定期的に再生する必要がある。

酵素電極を製造する別の方法が米国特許第5,160,418号明細書に記載されている。そこに記載された電極は、ゼラチンまたはヒドロキシエチルセルロースのような低温結合剤に添加された微細に分割された白金担持炭素に吸着された酵素を含む懸濁液でできている。次に、この懸濁液を導電性炭素紙上に載せ、乾燥させる。しかし、結合剤は水溶性であり、その結果、水性サンプルに浸漬すると懸濁液が溶解する。従って、電極は再使用できない。

#### 発明の概要

本発明によると、バイオ試薬を固定化でき、乾燥すると耐水性の層またはフィルムになる固定化媒質が提供される。具体的には、本発明の固定化媒質は、分配可能な均質な懸濁液の形であり、(i)液体または流体の結合試薬と(ii)固層に固定化したバイオ試薬の複合体とを含み、この複合体が結合試薬内に均一に分散されている。懸濁液はさらに媒質中に均一に分散された補助成分を含んでもよく、これらの補助成分は媒質に電気

化学特性を与え、固定化したバイオ試薬の安定性を高め、および／または乾燥して、実質的に耐水性または非水溶性の層となる媒質の能力を改善できるものである。

本発明の固定化媒質は、固定化したバイオ試薬を使用する本質的にすべての検

定フォーマットに使用できる。本発明の一つの実施態様によると、本発明で提供される固定化媒質を支持物質に塗布して、支持物質上に非水溶性層を形成することにより酵素電極を製造できる。次に、酵素電極を対電極と参照電極と共に使用して、その酵素の基質の生物学的変換を電気化学的に検出できる。

本発明の別の実施態様によると、結合試薬および固定化した酵素を含む固定化媒質を表面に塗布して、非電気化学的手段によりその酵素の基質の生物学的変換を検出するバイオセンサを形成することもできる。

本発明の別の実施態様によると、固定化試薬を、当業界で公知の不均質免疫検定フォーマットに使用するための固体支持体に塗布することができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、柔軟性のあるバイオセンサ電極プラットフォーム

を示している。

第2図は、電流電極のフローセルアセンブリの拡大図である。

#### 発明の詳細な説明

本明細書には下記の定義を使用できる。

#### 定義

本明細書で使用する「分析物」とは、エピトープまたは結合部位を少なくとも一つ有する、検出または測定すべき化合物または組成物を意味する。分析物は、それに対する天然の結合相手がある、または結合相手を製造できる物質であればよい。分析物には、毒素、有機化合物、蛋白質、ペプチド、微生物、アミノ酸、炭水化物、核酸、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬剤（治療目的および不法な目的で投与される薬剤を含む）、ウィルス粒子、ならびに上記物質全ての代謝物および上記物質全てに対する抗体を含むが、これらに限定されるものではない。例えば、このような分析物には、フェリチン、クレアチニンキナーゼMB（CK-MB）、ジゴキシン、フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、テオフィリン、バルプロン酸、キニン、黄体ホルモン（LH）、濾胞刺激ホルモン（FSH）、エストラジオール、

プロゲステロン、IgE抗体、ビタミンB2マイクログロブリン、糖化ヘモグロビン (Gly. Hb)、コルチゾール、ジギトキシン、N-アセチルプロカインアミド (NAPA)、プロカインアミド、風疹に対する抗体、例えば風疹IgGおよび風疹IgM、トキソプラズマ症に対する抗体、例えばトキソプラズマ症IgG (Toxo-IgG) およびトキソプラズマ症IgM (Toxo-IgM)、テストステロン、サリチレート、アセトアミノフェン、B型肝炎ウィルス表面抗原 (HBsAg)、B型肝炎核抗原に対する抗体、例えば抗B型肝炎核抗原IgGおよびIgM (抗HBC)、1型および2型ヒト免疫不全ウィルス (HTLV)、B型肝炎e抗原 (HBeAg)、B型肝炎e抗原に対する抗体 (抗HBe)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、チロキシン (T4)、総トリヨードチロニン (総T3)、遊離トリヨードチロニン (遊離T3)、癌胎児性抗原 (CEA) およびアルファ胎児性蛋白質 (AFP)、およびアンフェタミン、メタアンフェタミン、バルビツール酸類、例えばアモバルビタール、セコバルビタール、ペントバルビタール、フェノバルビタールおよびバルビタール、ベンゾジアゼピン類、例えばリブリウムおよびバリウム、

カンナビノイド類、例えばハシシュおよびマリファナ、コカイン、フェンタニル、LSD、メタプアロン、アヘン類、例えばヘロイン、モルヒネ、コデイン、ヒドロモルホン、ヒドロコドン、メタドン、オキシコドン、オキシモルホンおよびオピウム、フェンサイクリジンおよびプロポキシヘンを含むが、これらに限定されない依存性薬剤および規制物質を含むが、これらに限定されない。「分析物」には、任意の抗原性物質、ハプテン、抗体、高分子およびそれらの混合物も含む。

本明細書に使用する「分析物アナログ」とは、分析物に特異的な結合相手と交差反応する物質を意味するが、分析物自体とその程度の大小は問わない。分析物アナログには、分析物アナログが対象の分析物と共通したエピトープ部位を少なくとも一つ有している限り、修飾した分析物および分析物の断片部分または合成部分も含むことができる。分析物アナログの1例は、分析物アナログが分析物に特異的な結合相手と結合できるように、分析物分子全体の少なくとも

一つのエピトープを複製する合成ペプチド配列である。

本明細書で使用する「生物学的変換」とは、一つのものから他のものへの物質の変換を意味する。酵素がその基質に作用し

て、変換された基質を生成することがこの生物学的変換の1例である。

本明細書で使用する「検出可能部分」とは、検出可能な物理特性または化学特性を有し、結合相手を標識するために使用して、結合相手と接合体を形成できる化合物または従来検出可能な化学的グループを意味する。このような検出可能な化学的グループには、酵素活性のあるグループ、例えば酵素、酵素基質、補欠分子族基または補酵素、スピンラベル、蛍光分子、例えば蛍光剤および蛍光源、発色団および色原体、発光分子、例えば発光体、化学発光体および生物発光体、燐光性分子、特異的結合可能なリガンド、例えばビオチンおよびアビジン、電気活性な種、放射性同位元素、毒素、薬剤、ハプテン、DNA、RNA、多糖類、ポリペプチド、リポソーム、着色粒子、着色微粒子等でありうるが、これらに限定されるものではない。本明細書で使用する「特異的結合相手」とは、特異的結合対、すなわち、二つの分子の一方が化学的または物理的手段を介してもう一方の分子と特異的に結合する二つの異なる分子の一つを意味する。抗原と抗体の特異的結合対の他に、他の特異的結合対には、アビジンとビオチン、炭水化物とレクチン、相補的

ヌクレオチド配列、相補的ペプチド配列、エフェクタ分子と受容体分子、酵素のコファクタまたは基質と酵素、酵素阻害剤と酵素、ペプチド配列とその配列または全蛋白質に特異的な抗体、ポリマー酸と塩基、染料と蛋白質結合剤、ペプチドと特異的な蛋白質結合剤（例えば、リボヌクレアーゼ、S-ペプチドおよびリボヌクレアーゼS-蛋白質）等を含むが、これらに限定されない。さらに、結合対には、元の結合相手のアナログである結合相手、例えば分析物アナログまたは遺伝子組み換え手法または分子工学により作製した結合相手がある。結合相手が免疫反応体であった場合、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、組み換え蛋白質または組み換え抗体、キメラ抗体、上記物質の混合物また

は断片、および結合相手として使用することの好適性が当業者によく知られているこのような抗体、ペプチドおよびヌクレオチドの製剤であってよい。

本明細書で使用する「テストサンプル」とは、分析物を含有することが疑われる物質を意味する。テストサンプルはその供給源から得られたものを直接使用することができ、または予備処理してサンプルの特性を変化させた後に使用することもできる。テストサンプルは、任意の生物学的供給源、例えば、血液、

唾液、水晶体液、脳脊髄液、汗、尿、乳汁、胸水、粘膜、髄液、腹腔液、羊水等のような生理学的な流体、発酵ブロス、細胞培養、化学反応混合物等から得たものであってよい。テストサンプルは使用前に予備処理することができ、例えば、血液から血漿を調製し、粘性流体等を希釈することができる。処理法には、濾過、蒸留、濃縮、妨害成分の不活化、試薬の添加を含むことができる。生物学的流体または生理学的流体の他に、他の液体サンプル、例えば、水、食品等を使用して、環境または食品製造検定を実施することができる。さらに、分析物を含有することが疑われる固体物質もテストサンプルとして使用できる。場合によっては、固体のテストサンプルを修飾して、液体媒質を形成する、または分析物を放出させることが好都合なこともある。

## I. 固定化媒質

本発明の固定化媒質は、(a) 固相に固定化したバイオ試薬と (b) 固定化したバイオ試薬が均一に分散されているラテックス樹脂を含む結合試薬とを含む、分配可能な均質な懸濁液の形である。固定化媒質は、媒質の特性を増強し、所望の性能を得るための補助成分も含んでいてよい。混合物の成分は全体と

してペンキ様の流体を形成するため、ペンキと同様の物性を有し、支持物質表面に容易に塗布できる。さらに、混合物は乾燥すると、非水溶性のフィルムを形成し、混合物を塗布した表面にその成分を固定化する。本発明の固定化媒質は支持物質にバイオ試薬を永久的に固定化できると理解される。

本発明の媒質は非水溶性のフィルムを形成でき、従って支持物質にバイオ試薬を永久的に固定化できるため、例えば再使用可能なバイオセンサ酵素電極を提供

するのに有利に使用できる。もちろん、本発明で提供される固定化媒質で製造したすべての物品は再使用可能であると理解される。

#### A. 固相

本発明によると、固相は、例えば、バイオ試薬を固定化でき、固定化混合物中に実質的に均一に分散できる、炭水化物、無機物質、有機物質、合成有機物質、または上記物質の組み合わせからなる固体物質であってよく、好ましくは、微細に分割した固体物質である。このような固相を選択できる有機物質には、アガロース、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基またはヒドラジド官能基を含むアガロース誘導体、ポリアクリルアミド、アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基またはヒドラジド官能

基を含むポリアクリルアミド等を含むが、これらに限定されない。無機固相物質には、シリカ、アルミノシリケート（例えば、ゼオライト）、酸化アルミニウム、炭素または黒鉛粒子、白金族の金属、例えば白金、パラジウムまたはロジウムが吸着している炭素または黒鉛粒子、白金族金属の酸化物が吸着している炭素または黒鉛粒子、一級、二級または三級アミン官能性ポリマーが吸着している無機物質、四級アンモニウムポリマー、例

えば Merquat<sup>®</sup> (Quaternium-40) を吸着させた無機物質等を

含むことができる。さらに、固相を選択できる無機物質および有機物質の組み合わせには、金属ポルフィリン、例えばコバルトプロトポルフィリンを吸着させた炭素粒子または黒鉛粒子を含むことができるが、これらに限定されない。好ましくは、固相は直径約25ミクロン未満で、表面積が少なくとも約200 m<sup>2</sup>/gである微細に分割された粒子を含んでいる。粒径約0.1ミクロン未満の固相が特に好ましい。当業者には理解されるように、固相を結合試薬に分散させると、粒状の固相の大きさが非常に小さくなることがある。従って、固相の元の大きさは本発明を限定するものではないことはもちろん理解されよう。

微細に分割された固相を使用することの利点は、このような固相はバイオポリ

マー固定化能が高いことである。その結果、いくつかのバイオ試薬を一つの固相粒子に結合することができる。この方法で、結合試薬中に分散させた固相の量を減少させながら、生物活性を上昇させることが可能である。さらに、微細分割した固相を使用すると、本発明で提供される媒質が乾燥した後に形成される層またはフィルムのテクスチャが増強される。

#### B. バイオ試薬

本発明のバイオ試薬には、分析物、分析物アナログ、特異的結合対の構成要素、検出可能部分等を含むが、これらに限定されるものではない。バイオ試薬はもちろん、固定化試薬を使用する目的によって異なると理解される。例えば、酵素電極の場合、バイオ試薬は酵素であり、上記のような固定化媒質を支持物質に塗布する。このような酵素には、グルコースオキシダーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、グリセロールリン酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コレステロールエステラーゼ、リパーゼ、グリセロールキナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、クレアチニンデアミナーゼま

たは乳酸オキシダーゼを含むが、これらに限定されるものではない。免疫検定の場合、バイオ試薬は特異的結合対の構成要素である。

### II. バイオ試薬の固相への固定化

バイオ試薬は当業界でよく知られている方法で固相に結合することができる。このような方法には、吸着、イオン結合、共有結合等を含むが、これらに限定されない。

#### A. バイオ試薬の固相への吸着

バイオ試薬は、バイオ試薬を固相に吸着させることにより、固相に固定化し、固相／バイオ試薬複合体を形成することができる。一般に、バイオ試薬の固相への吸着は当業界でよく知られている方法で実施できる。もちろん、バイオ試薬の固相への吸着能は、この二つの物質を含むバッファのpHおよびイオン強度の関数であることは理解されよう。従って、もちろん、適切な吸着を達成するために、バイオ試薬と固相を含有するバッファのpHおよびイオン強度を、使用している具体的なバイオ試薬および／または具体的な固相に応じて変化させることは

理解されよう。好ましくは、溶液中のバイオ試薬濃度が粒状の固相の表面の非特異的結合部位を飽和するように、バイオ試薬

を固相混合物に溶解する。従って、バッファのpHおよびイオン強度は、バイオ試薬が固相に最大限吸着されるようなものであることが好ましい。

#### B. バイオ試薬の固相へのイオン性固定化

一般に、荷電されたバイオ試薬と反対に荷電された固相による吸引力を利用して、バイオ試薬を固相に固定化でき、その結果、固相／バイオ試薬複合体が形成される。好ましくは、正に荷電された化合物が固相に吸着される、または固相と共有結合する陽イオン性の固相は陰イオン性のバイオ試薬と反応して、固相／バイオ試薬複合体が得られる。固相に正の荷電を付与するのに適した化合物には、四級アンモニウムポリマー、例えば

**Merquat<sup>®</sup> (Quaternium-40)、アミン官能性ポリマー、例えばポリエチレンーイミン等があるが、これらに限定されない。**

好適な溶媒に溶解した過剰な化合物を固相に添加することにより、これらの化合物を固相に容易に吸着できる。十分な時間が経過した後、固相は、例えば濾過または遠心分離により回収できる。固相を好適な溶媒ですすいだ後、固相を再度回収することにより、残存する化合物をすべて固相から分離することが

できる。次に、すすいだ固相は湿ったまま使用し、あるいは、バイオポリマーを固相にイオン結合させる前に乾燥させることができる。

陽イオン性固相に本質的にイオン結合するであろう陰イオン性のバイオ試薬（例えば、酵素および蛋白質）があるが、酵素または蛋白質と固相との間により多くのイオン結合を形成できるように、酵素またはその一部を陰イオンを付与するように修飾するのが好ましい。

例えば、酵素または蛋白質に負の電荷を与える一つの方法は、例えば、脂肪族または芳香族の無水カルボン酸と反応させることである。このような無水カルボ



ン酸には、ピロメリト酸二無水物、無水コハク酸、無水マレイン酸等を含むが、これらに限定されない。

好ましい実施態様によると、例えば、ピロメリト酸二無水物を正に荷電されたアミノ基と反応させることにより、酵素または蛋白質に負の電荷を提供し、酵素または蛋白質に存在するアミノ基を三つの負に荷電された芳香族トリカルボキシレートに変換することができる。この変換は、酵素または蛋白質の溶液にピロメリト酸二無水物の水性懸濁液を加えて実施できる。好

ましくは、pHが約6.5から約8.0、好ましくは約7.0から約7.5の好適バッファに酵素または蛋白質を溶解させる。ピロメリト酸二無水物の量はバイオポリマー量の約0.05から約0.5倍、好ましくは酵素または蛋白質の量の約0.05倍から約0.15倍である。アミノ基の芳香族トリカルボキシレートへの変換は一般に約5分で完了するが、反応混合物を周囲温度で約10分から約20分間インキュベートすることが好ましい。次に、この反応混合物を陽イオン性の固相に直接加えてもよく、陽イオン性の固相と反応させる前に精製してもよい。

バイオ試薬と固相は反対の電荷を有しているので、この二つの物質間に容易にイオン結合が形成される。一般に、荷電された固相は、陰に荷電されたバイオ試薬に対する結合能が高い。好ましくは、バイオ試薬の濃度は、固相の陽イオン結合部位を飽和するようなものである。陽に荷電した固相の懸濁液を陰に荷電したバイオ試薬に添加して反応混合物を形成する場合、バイオ試薬と固相の比は約1:1.5から約1:5の間である。好ましくは、反応をpH約6.5から約7.5のイオン強度の低いバッファ中で、約1分から約30分間、約2℃から約25℃の温度で実施する。このように形成されたバイオ試薬／固相

複合体は、当業界でよく知られている方法で未結合のバイオ試薬から分離してから、結合試薬に加えてもよく、反応混合物中に維持したまま、結合試薬に直接添加してもよい。複合体を反応混合物から分離する場合、バイオ試薬／固相複合体を捕らえるのに十分小さく、未結合のバイオ試薬を通過させるには十分大きな孔

径を有するフィルターを使用して、反応混合物を濾過することができる。また、複合体を遠心分離して、湿ったペレットを形成することもできる。すべての未結合バイオ試薬を確実に複合体から除去するために、pH約6.0から約7.5のイオン強度の低いバッファで、捕えた複合体を洗浄することができる。

また、バイオ試薬と固相を一つのステップでイオン結合させ、溶液から共沈させることもできる。一般に、この沈殿は、先ずバイオ試薬と固相の一つの溶液を作製し、溶液をピロメリト酸二無水物で処理し、次に溶液を上記の正に荷電されたポリマーの一つで処理して実施する。好ましくは、バイオ試薬と固相の比は約1:1から約1:5であり、溶液中のピロメリト酸二無水物の量は溶液中のバイオ試薬の量の約0.05倍から約0.15倍である。

もちろん、バイオポリマーを固相にイオン結合させうる方法は、本明細書に記載の方法に限定されるものではなく、当業界で公知の他の方法も同様に使用できることが理解される。

#### C. バイオ試薬の固相への共有結合による固定化

バイオ試薬と固相との間に形成される共有結合により、バイオ試薬を固相に固定化して、バイオ試薬／固相複合体を形成することができる。このような共有結合を形成するために、バイオ試薬と共有結合を形成できるように固相を修飾することができる。このような固相の修飾には、固相への官能基、例えばアミン基、カルボン酸基、エポキシド基等を添加することが含まれるが、これらに限定されない。例えば、当業界でよく知られた方法を使用し、シリカをアミノプロピルトリエトキシシランまたはポリエチレンイミンで誘導体化できる。このような修飾が完了した後、当業界でよく知られた方法で、アミノ化した固相をさらに誘導体化して、他の官能基を導入することができる。次に、当業界でよく知られた方法で、バイオ試薬を誘導体化した固相に共有結合させることができる。例えば、水溶性カルボジイミド、例えば3-エチル1-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、または同様のカルボン酸活性化剤を、修

飾した固相とバイオ試薬を含有する適当なバッファに加えて、共有結合したバイ

オ試薬／固相複合体を形成することができる。この複合体はカルボン酸とアミノ基との間のアミド結合を介して形成される。

また、上記のように、修飾した固相を修飾した酵素と反応させることもできる。このような修飾した酵素には、当業界でよく知られた方法を使用して、上記のようなピロメリト酸二無水物、または他の一無水物または多無水物、例えばN-カルボキシー- $\alpha$ -アミノ酸無水物で修飾したもの等を含むが、これらに限定されない。

バイオポリマーを固相に共有結合する別の方法では、当業界でよく知られているヘテロ二官能性結合化合物を使用できる。このような化合物には、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(S-SMPB)、m-マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(S-MBS)、N- $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル(GMBS)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン1-カルボキシレー

ト(SMCC)、米国特許第4,994,385号明細書に記載のもの等を含むが、これらに限定されない。二つの化合物を共有結合させるためにこのような化合物を使用する方法は当業界でよく知られている。

本発明によると、1種またはそれ以上のバイオ試薬を固相に固定化できると理解される。例えば、個々の抗原に特異的な異なる抗体を一つの固相に固定化できる。別の例では、個々の基質に特異的な異なる酵素を一つの固相に固定化できる。

もちろん、バイオ試薬を固相に共有結合できる方法は本明細書に記載の方法に限定されるものではなく、当業界で公知の他の方法も使用できると理解される。

### III. 結合試薬

本明細書に記載のように、バイオ試薬を固相に固定化して、バイオ試薬／固相複合体を形成した後、バイオ試薬／固相複合体を結合試薬と合わせて、本発明の固定化媒質を形成する。結合試薬はバイオ試薬／固相複合体がその中に均一に分散されている液体または流体である。結合試薬は支持物質表面で乾燥すると、バ

イオ試薬／固相複合体をその表面に不可逆的に接着させることができる。予期しなかったことに、また、驚くべき

ことに、本発明によると、結合試薬は乾燥すると、物理的耐久性のある耐水性層となり、この層はバイオ試薬の生物学的活性を保持する。さらに、結合試薬は、滑らかな表面または非多孔性表面ならびに多孔性表面を含むが、これらに限定されない、種々の表面に接着する。

結合試薬が流体であるため、本発明の固定化媒質は種々の方法で支持物質に分配または施工できる。従って、例えば、固定化媒質は、塗布、ポンピング、液体計量、スクリーン印刷、噴霧、ジェッティングまたは固定化媒質への支持物質の浸漬により、分配できる。さらに、固定化媒質は周囲温度で乾燥できるので、媒質中に分散させたバイオ試薬／固相複合体はバイオ試薬成分を変性させる可能性のある有害な温度になることがない。

さらに、固定化媒質は乾燥して耐水性の接着層になるため、固定化媒質を塗布するまたは乾燥させる表面は再使用できる。さらに、塗布する表面の種類により結合試薬が限定されることはない。

本発明の結合試薬はラテックス樹脂である。本発明に適するラテックス樹脂には、アクリルラテックス、酢酸ビニルラテッ

クス、スチレンアクリルラテックス、ポリウレタンラテックス等の一又は二以上が含まれるが、これらに限定されるものではない。結合試薬は、媒質に電気化学特性を提供し、固定化されたバイオ試薬の安定性を高め、および／または媒質が乾燥して、実質的に耐水性または非水溶性層になる能力を改善する補助成分も含むことができる。このような補助成分には、可塑剤、濃厚剤、フィルム形成剤、安定剤、分散剤、消泡剤、電気化学的活性物質等を含むが、これらに限定されない。このような任意成分の例には、可塑剤、例えばフタル酸ジブチルおよびセバシン酸ジオクチル、濃厚剤、例えばヒドロキシエチルセルロース、シリカおよびAcrysol SCT 200、フィルム形成剤、例えば2-エトキシエタノール、エチレングリコールモノプロピルエーテルおよび2-(2-ブトキシエトキシ)エタノー

ル、安定剤、例えば蔗糖、トレハロース、デキストランおよびポリエチレン

グリコール、分散剤、例えば *Triton* X-100<sup>®</sup> 洗剤、

消泡剤、例えば2-オクタノール、および電気化学的活性な薬剤、例えば白金担持炭素または白金担持黒鉛等を含むが、これらに限定されない。

もちろん、固定化試薬に含まれる化合物およびその量は、添

加する特定の固相、使用する分配工程、または乾燥ステップおよび硬化ステップの特性に依存することは理解されよう。例えば、可塑剤はコーティングのひび割れを防止するために必要とされる可能性があり、濃厚剤は懸濁した固体の沈殿を防止するために望ましい可能性があり、フィルム形成剤、一般に有機溶媒は、可塑剤を安定化し、滑らかなコーティングが得られ乾燥速度を調整するために必要な可能性があり、安定剤は乾燥工程の間および後にバイオポリマーの安定化を促進するために必要な可能性があり、分散剤はポリマーの凝集を防止するために必要な可能性があり、消泡剤は混合の間の気泡形成を減少させるために必要な可能性があり、電気化学的活性な薬剤は固定化媒質を電気的および／または電気化学的に活性化するために必要な可能性がある。可塑化、濃厚化、フィルム形成、分散、消泡および導電性を強化するために使用できる特定の化合物およびその量は、ラテックス塗料業界でよく知られており、当業者の知識の範囲である。

結合試薬に添加できるバイオ試薬／固相複合体および補助的固体の最適量は、固定化媒質の臨界的顔料容量濃度 (CPVC) の関数である。当業者に理解されるように、CPVCは結合試

薬と結合試薬に含まれる顔料 (粒子) の量の関係を意味する。CPVC未満の結合試薬は、粒子が埋め込まれているが、互いに接触してはいない連続的な結合試薬相を有するコーティングを形成する。反対に、CPVCを超える結合試薬は連続した結合試薬相を有していないが、埋め込まれた粒子は互いに接触している。

CPVCを超える試薬で形成されたコーティングの物理特性はCPVC以下の試薬で形成されたコーティングの物理特性と異なる。例えば、電気的輸送および

バリア輸送、密度、機械強度等の特性がCPVCの影響を受ける。本発明によると、予期しなかったことに、また、驚くべきことに、結合試薬中に懸濁した固体の量が実質的にCPVCより高い場合、コーティングの導電性および透過性は、コーティングの物理強度を損なうことなく、最適化されることが判明した。

固相／バイオ試薬複合体懸濁液を結合試薬に直接添加しても、結合試薬に添加する前に、回収して、洗浄してもよいことは理解される。もちろん、結合試薬にバイオ試薬／固相物質を物理的に分散させる方法が固定化媒質で作製されたフィルムの性質に影響を与える可能性があることは理解される。従って、均質

な混合物を形成するために、バイオ試薬／固相複合体を結合試薬に十分分散させることが好ましい。複合体を分散させる方法には、高剪断均質化、ボールミル処理等を含むが、これらに限定されない。

本発明の固定化媒質を形成する場合、一又は二以上の異なる種類のバイオ試薬／固相複合体を結合試薬中に分散させることができると理解される。例えば、固相に固定化した1種の酵素を、固相に固定化した別の種類の酵素を含有する固定化媒質に加えることができる。同様に、固相に固定化した一つの抗原に特異的な抗体を、固相に固定化した別の抗原に特異的な抗体を含有する固定化媒質に加えることができる。もちろん、このような添加は同時に順次にも実施することも理解されよう。

#### IV. 支持物質

一般に、本発明の支持物質には、ビーズ、磁気粒子、微粒子またはマクロ粒子、管、試験管、マイクロタイタプレート、電気化学的物質、膜等を含むが、これらに限定されない。このような支持物質は合成物質、天然物質、または合成的に修飾した天然物質から製造でき、セルロース物質、例えば紙、セルロー

スおよびセルロース誘導体、例えば酢酸セルロースおよびニトロセルロース、ガラス繊維、天然の布、例えば綿、合成の布、例えばナイロン、多孔性ゲル、例えばシリカ、アガロース、デキストランおよびゼラチン、多孔性繊維マトリックス、澱粉をベースとする物質、例えば架橋結合したデキストラン鎖、セラミック材

料、オレフィン、またはポリ塩化ビニル、ポリエチレン、ポリ酢酸ビニル、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリスチレン、酢酸ビニルと塩化ビニルのコポリマー、ポリ塩化ビニルとシリカの混合物を含む熱可塑性物質を含むが、これらに限定されない。

もちろん、固定化媒質を塗布する支持物質は固定化媒質を支持できなければならず、表面は支持の目的に適したものでなければならないことは理解されよう。例えば、固定化媒質を電流電極または電位差電極として使用しようとする場合、表面は電気化学的伝導性のある物質であるか、かかる物質と結合していることが好ましい。このような支持物質には、銅、白金、金、パラジウム、チタン、導電性の炭素または黒鉛インクで被覆したチタン、導電性プラスチック等を含むが、これらに限定されない。

本発明によると、一つの表面を複数の固定化媒質のコーティングで被覆することができる。特に、表面を同じ固定化媒質の複数の層で被覆することができ、あるいは、二つ以上の異なる種類の固定化媒質で順次被覆することもできる。例えば、コレステロールオキシダーゼ／固相複合体を含む固定化媒質を白金担持炭素支持物質に塗布し、乾燥させた後、コレステロールエステラーゼ／固相複合体を含有する第二の固定化媒質を塗布し、乾燥させて、テストサンプル中のコレステロール量を測定するための酵素電極を形成することができる。

#### V. バイオリアクタおよびバイオセンサ

本発明によると、バイオリアクタは、本発明の固定化媒質を反応生成物の検出に関与しない表面に塗布することにより製造できる。この実施態様によると、乾燥させた固定化媒質にサンプルを接触させる間または後に、光学指示物質をサンプルに加えることにより、サンプル中の基質の存在／量を光学的に測定することができる。光学的指示物質は、酵素とその基質との反応の副産物と反応して、例えば、色、蛍光および発光の変化を生じさせるものであってよい。例えば、生じた色、蛍光、発光を基質が既知量の場合の予期値と比較することにより、サン

ブル中に存在する基質の量を定量できる。この比較は可視的に、または分光光度

計、蛍光計または発光計のような分析器で実施できる。

本発明の固定化媒質は、バイオセンサデバイスの製造にも使用でき、このデバイスでは酵素基質の反応を電気化学的センサまたは光学センサで直接モニタする。電気化学的バイオセンサは、本明細書上記のように、電導性固相および／または電気化学的活性な固相を含有する本発明の固定化媒質を、導電性指示物質に塗布または分配し、乾燥させることにより作製できる。もちろん、電導性および／または電気化学的に活性な固相の上にバイオポリマーを固定化させることができ、あるいは、このような固相を補助的成分として、バイオポリマー／固相複合体を含有する固定化媒質に加えることができると理解されよう。また、例えば、酵素／固相複合体を含有する固定化媒質を電気化学的に活性なセンサデバイスの上にコーティングとして塗布してバイオセンサを作製できることももちろん理解されよう。

次に、その上に固定化媒質を乾燥させたこのような支持物質を電流または電位差検出デバイスと共に使用して、テストサン

プルと接触させたときにこのような支持物質により生じる電流または電圧を測定することができる。このようなデバイスの構成は当業者には容易に明らかであろう。光学センサの実施態様では、固定化試薬を光学センサの表面、例えば反射したまたは化学的に調整された光を測定できる光ファイバデバイスの末端に塗布することができる。例えば、本発明で提供される固定化媒質は、米国特許第4,810,655号明細書および米国特許第4,925,268号明細書に記載のような酸素濃度を光学的に検出できる酸素センサに使用することができる。次に、オキシダーゼ酵素による酸素の消費をこのようなセンサで直接測定することができ、これは消費されたオキシダーゼの共基質の量と比例する。

## VI. 結合検定

本発明によると、固定化媒質を、当業界で公知の慣用の特異結合検定フォーマットと共に使用する試薬の作製にも使用できる。このような方法には、競合免疫検定、サンドイッチ免疫検定、イムノメトリック免疫検定等を含むが、これらに限定されない。



このような検定を実施するための検定試薬は多様な形を取り

うるが、一般に、(1) 検出すべき分析物、(2) 分析物に対する特異的結合相手および(3) 標識した試薬を含む。検定試薬は同時にまたは順次混合することができ、結合の程度が存在する分析物の量の関数となるように、標識した試薬は対応の結合相手と結合する。通常は、結合した種と遊離している種とを互いに物理的に分離し、使用した特定の標識の活性を測定することにより、各画分中に存在する標識の量を測定する。このような分離は、これらの種の一つを支持物質に固定化し、捕獲試薬を形成することにより実施することが多い。このような捕獲試薬は、本明細書に記載の支持物質に固定化媒質を塗布することにより作製できる。例えば、競合的不均質免疫検定方式では、特異的な結合相手例えば抗体を支持物質に固定化し、捕獲試薬を形成することができる。次に、分析物を含有するテストサンプル、捕獲試薬、および検出可能部分で標識した分析物を含む標識した試薬を含む反応混合物を形成して、上記のような結合型の種および遊離型の種、すなわち、標識した試薬に結合した分析物と捕獲試薬に結合した標識分析物を形成する。これらを分離し、分析物に結合した標識試薬の量または捕獲試薬に結合した標識試薬の量を検出し、テストサンプル中に存在する分析

物の量と相関させることができる。同様に、サンドウィッチ型不均質免疫検定方式では、分析物を含有するテストサンプルを、支持物質に固定化させた抗体と検出可能部分で標識した抗体を含む標識試薬とに接触させて、固定化した抗体、分析物および標識試薬を含む固定化複合体を形成する。これらを分離し、固定化した複合体中の標識試薬の量、または遊離の標識試薬の量を検出し、テストサンプル中に存在する分析物の量と相関させることができる。

従って、このような免疫検定方式に使用するための捕獲試薬は、本発明の固定化媒質を使用し、本発明の固定化媒質を支持媒質に塗布して製造できるが、この固定化媒質は、例えば、本発明の教示に従って、固相に固定化した特異的結合相手を含む。

検定終了時、このような捕獲試薬は、所望に応じて、次の検定に使用するため

に再生することができると理解される。捕獲試薬の再生特性は、このような試薬を作製するために使用する乾燥した固定化試薬の安定性によるものである。当業界でよく知られた方法により、捕獲試薬から結合した分析物を解離させることにより、捕獲試薬を再生できる。

## VII. テスト用キット

本発明のテスト用キットは、本発明の固定化媒質を塗布した支持物質を使用する、本発明で考慮する種々の検定を実施するために必要な必須な試薬を全て含んでいる。このようなテスト用キットは、試薬の適合性が許容する組成物または混合物として、必要な試薬を保持する一つまたは複数の容器の組み合わせとして、市販のパックの形で提供される。テスト用キットは、もちろん、当業界で公知の、市販品使用者の観点から望ましい可能性のある他の物質、例えば、バッファ、希釈剤、予備処理用試薬等を含むことができることを理解されよう。

一つの実施態様によると、テスト用キットは上記のような不均質免疫検定を実施するために提供され、ここで使用される捕獲試薬は本発明の固定化媒質を含む。

以下の実施例は本発明を限定するためのものではなく、本発明を説明するためのものである。

### 実施例1

#### グルコースオキシダーゼ酵素電極の製造

グルコースオキシダーゼを白金担持炭素に固定化し、次に、吸着された酵素を、カルボキシル化ポリスチレン／アクリル樹

脂 (Pliolite 樹脂 7104) および水溶性スルホン化ポリエステルポリマー (AQ55) を含有するコーティング溶液に混合する。この処方を均質な混合物を形成するのに最適化し、この混合物を導電性炭素インク表面上に被覆し、電気化学的にテストした。AQ55 ポリマーは白金担持炭素を樹脂全体に分散させ、樹脂が乾燥したときに接着性コーティングを形成するのに役立つ。

#### 材料

1. 白金10%を含有する白金担持Vulcan XC 72 (カーボンブラック) (E-Tek社、米国マサチューセッツ州フラミンガム)
2. グルコースオキシダーゼ (GOD: *Aspergillus niger* 由来、グレードI、Boehringer Mannheim Biochemicals、米国インディアナ州インディアナポリス)
3. リン酸緩衝食塩水 (PBS: 100mMリン酸ナトリウム、100mM NaCl、pH6.0)
4. AQ55ポリマー (固体、Eastman Chemicals、米国テネシー州キングスポート)
5. Pliolite Waterborne樹脂7104 (Goodyear Chemicals、米国オハイオ州アクロン)

#### 手順

白金担持炭素 (50mg) をPBSバッファ (0.4ml) に加え、Omni Mixer2000 (Omni International、米国コネチカット州ウォーターベリーから市販) を使用し、最高速度1分間均質化した。GOD溶液 (PBS 0.1ml中6.9mg) を白金担持炭素に加えて、懸濁液を形成し、上記のように均質化した。次に、懸濁液を周囲温度で1時間インキュベートしてから、AQ55ポリマー (水0.15ml中42mg) を加え、懸濁液を上記のように再度均質化した。次に、樹脂 (固形分44%の溶液0.075ml) を加え、懸濁液を上記のように均質化した。ペンキブラシを使用して、特注の電流電極の表面に、得られた固定化媒質を2回塗布した。

ここで図面を参照して、第1図は、本発明で使用する電流電極を作製するために使用する柔軟な電極プラットフォーム10を示している。導電性部分20、22、24、26および28

は導電性炭素 (Acheson Colloids、米国インディアナ州フィッシャーズから市販) であり、ポリエステル製の固体基板15にスクリーン印刷した。銀/塩化銀インク (Olin Hunt、米国カリフォルニア州オンタリオ

から市販)を直径1.0mmの参照電極11を導電性部分20の頂部にスクリーン印刷し、ポテンシオスタットとの電氣的接点のためには導電性銀および炭素部分(Acheson Colloidsから市販)を使用した。作動電極は、導電性部分22、24、26および28の頂部に固定化媒質約0.5 $\mu$ lを小さなインクブラシで塗布して、直径約1.0mmの円形の媒質付着体30、32、34および36を形成した。

第2図によく示されているように、柔軟な電極プラットフォーム10に固定したスクリー70、ナット80、およびガイドピン90および100、ならびに、小型の硬いプラスチック裏打ちプレート40と大型の硬いプラスチック裏打ちプレート60の間に柔軟なシラスティックのガスケット50がある。スクリー70およびピン90および100が上記成分全てを通るようにするために、小型裏打ちプレート40に開口部72、74および76を設け、柔軟な電極プラットフォーム10に開口部12、14および16を設け、ガスケット50に開口部

52、54および56を設け、大型裏打ちプレート60に開口部62、64および66を設けた。

ガスケット50は溝58も具備し、作動電極30、32、34および36および参照電極11の上に固定すると、40 $\mu$ lのフローセルが形成された。大型裏打ちプレート60には孔67および68があり、孔67および68はガスケット50に隣接して適切に固定するとフローセルの流入孔および流出孔として機能する。この電気化学的セル用補助電極は、大型裏打ちプレート60上に導電性炭素インク層65(Acheson Colloidsから市販)を分配して作製した。

完成した電極フローセルを導電性部分20、22、24、26および28を介してポテンシオスタットデバイスに接続した。蠕動ポンプを使用してPBSバッファと3mMのグルコースカリブレータ(PBS中)を別々にフローセル内に入れた場合の各々の電流をポテンシオスタットで測定した。初期負荷電流を散逸させた後、作動セル電位350mVで、グルコースオキシダーゼの作用によってグルコースと酸素から生成された過酸化水素の酸化からの最高電流を測定した。正

味のグルコース信号は、バッファシグナルとグルコースシグナルとの電流の差として計算した。

## 結果

まず、グルコース電極はグルコース 1 mM 当たり 1948 nA の電流を生成した。シグナルは室温で 1 週間のテスト期間中に定常的に低下したが、コーティングは無傷のままであった。従って、電極の製造に使用したコーティングは活性があり、耐久性を持ち、再使用可能であった。

## 実施例 2

### 白金担持炭素に吸着させたグルコースオキシダーゼを使用した酵素電極の製造

実施例 1 と比較し、このコーティング手順では、異なる樹脂と混合手順を使用した。速乾性で、接着性を有し、顔料を乳化できるような市販の工業用インク処方から下記の樹脂を選択した。混合手順は高剪断速度が得られるものであり、従って、顔料を非常によく分散し、小さな粒径が得られた。この滑らかなエマルジョンを得るために、歯科用アマルガム混合用デバイス WIG-L-BUG (Crescent Dental Manufacturing、米国イリノイ州リヨン) 中で処方成分を混合した。このミキサーはボールベアリングを持つ 2 ml のステンレススチールバイアル中で処方を機械的に攪拌する

るので、0.5 ml から 1 ml のコーティング製剤を混合できる。

## 材料

1. 白金を 10% 含有する白金担持 Vulcan XC 72 (カーボンブラック)
2. GOD
3. PBS
4. アクリル樹脂混合物 (下記の処方、不揮発性固形分 31.6%)

### アクリル樹脂混合物の成分

### 重量%

Joncryl 537 アクリルエマルジョン (Johnson Wax、  
米国ウィスコンシン州ラシーヌ)

Joncryl 56 アクリル樹脂 (Johnson Wax、	27
DMAMP 80 (Angus Chemical社、米国イリノイ州	
ノースブルック)	1
Ektasolve EP (Eastman Chemicals)	9
蒸留水	9

### 手順

PBSバッファ中の白金担持炭素の懸濁液にPBSバッファ中のGODの溶液を加えることにより、白金担持炭素に酵素を吸着させた。一つの懸濁液はPBS 0.44mlと50mg/mlのGOD溶液0.2ml中に白金担持炭素101mgを含み、もう一方の懸濁液にはPBS 0.2mlと50mg/mlのGOD溶液0.1ml中に白金担持炭素51mgを含んでいる。混合物を周囲温度で約1時間半、静かにインキュベートした後、2000rpmで遠心分離した。上清を捨て、得られた湿ったGOD/炭素ペレットを樹脂混合物0.8gに再懸濁し、WIG-L-BUG中で10分間混合した。得られたコーティング溶液をブラシで別々の電極上に塗り、実施例1と同様にテストした。この二つのコーティング溶液の処方下記表1に示す。

表 1

処方	炭 素 (mg)	樹脂混合物 (mg)	固体樹脂 (mg)	固体樹脂 / 炭素比
1	101	800	253	2.50
2	51	800	253	4.96

### 結果

処方1および処方2の両者共で、優れた接着性を有し、ひび割れや亀裂のないコーティングが作製された。処方2は樹脂の割合が高かったため、やや光沢があった。実施例1と同様に、過酸化水素およびグルコースの反応ならびに残留バックグラウンド電流および電気抵抗について電極をテストした。これらのテスト結果を下記表2に示す。

表 2

処 方	過酸化物の傾斜 (nA/mm)	グルコースの傾斜 (nA/mm)	バックグラウンド nA (バックグラウンド)	抵 抗 ( $\Omega$ )
1	1 9 0 0	2 8 2 . 6	1 2 6	3 5 - 4 0
2	3 0 0	2 2 . 9	5 8	7 5

上記の結果は、処方中の樹脂対固体（炭素）の比は、グルコースおよび過酸化物に対する電気化学的反応に影響を与えるが、バックグラウンド電流および電気抵抗に対してはわずかな影響しか与えなかったことを示した。炭素（顔料）が臨界顔料容量比に近い場合、コーティングの導電性および透過性は最適となるが、コーティングの物理的強度を損なう程高くはなかった。

### 実施例 3

#### シリカにイオン結合したグルコースオキシダーゼを使用した酵素電極の製造

本方法では、四級ポリマーで可溶性シリカと酵素を溶液から共沈させた。正に荷電したポリマー／シリカに対するGODのイオンの親和性を上昇させるために、GODをピロメリト酸二無水物で修飾した。その結果、GOD活性はほとんどまたはまったく損失することなく、アルカリ性pHでの失活を防ぐよう、酵素を安定化させた。

#### 材料

1. 10%白金を含有する白金担持Vulcan XC 72（カーボンブラック）
2. GOD
3. 修飾したリン酸緩衝バッファ（MPBS：1 mMのエチレンジアミン四酢酸および0.1%Kathon CGを保存料として含有する100 mMリン酸ナトリウム、100 mM NaCl、pH 7.4）
4. Snowtex UP、20%可溶性コロイド様シリカ溶液（日産化学工業、日本、東京）

5. ピロメリト酸二無水物 (1, 2, 4, 5-テトラカルボン酸二無水物、Aldrich Chemicals、米国ウィスコンシン州ミルウォーキー)

6. Magnifloc 591C、20重量%四級アンモニウムポリマー水溶液 (American Cyanamid社、米国ニュージャージー州ウェイン)

7. アクリル樹脂混合物 (下記の処方、不揮発性固形分8.85%)

<u>アクリル樹脂混合物の成分</u>	<u>重量%</u>
Joncryl 537 アクリルエマルジョン (Johnson Wax)	15.5
フタル酸ジブチル (Fluka Chemical、スイス・ブックス)	1.7
水酸化ナトリウム (3%溶液)	2.1
2-エトキシエタノール (Aldrich Chemicals)	5.0
蒸留水	75.7

#### 手順

GOD (20mg) をMPBSバッファ2mlに溶解し、Snowtex UP (可溶性シリカ100mg) 0.5ml

を加えて、混合物を形成した。次に、調製したばかりのピロメリト酸二無水物の懸濁液 (水1ml中20mg) 0.1mlを混合物に加えると、混合物は濁った。室温に約10分間置くと、混合物は清澄になり、二無水物のアシル化反応が完了したことを示した。反応終了後、反応混合物にMagnifloc 591Cの20mg/ml水溶液0.4ml (四級アンモニウムポリマー8mg) を加えた。Magnifloc溶液を加えると、シリカおよび大部分のGODが沈殿した。沈殿を遠心分離し、水で3回洗って、可溶性の塩を除去した。最終的なペレットを焼結ガラスフィルター上でアセトン10mlを使用して乾燥させると、シリカ、四級ポリマーおよびGODを含有する黄色の粉末89.5mgが得られた。

GOD/シリカコーティング試薬は、上記のGOD/シリカ66.0mgと上記のアクリル樹脂混合物934mgを合わせて調製した。白金担持炭素 (Vul



can XC 72) コーティング試薬は、乾燥した白金担持炭素66.0mgとアクリル樹脂混合物934.0mgを合わせて調製した。両者をWIG-L-BUG中で3分間混合した。これらの二つの溶液を使用して、表3に示す試薬を調製した。各試薬溶液のアリコ

ート(0.4 $\mu$ l)を、ガラスの毛細管マイクロピペットを使用して、手で作動電極(実施例1と同様)に載せ、15時間乾燥させた。得られた電極を、PBSバッファ中0.1mM過酸化水素と5mMのグルコース溶液を使用し、350mVでポテンシオスタットでテストした。電流は周囲温度で測定し、下記表4に示す。電極はPBSバッファ中、周囲温度で保存した。湿潤状態で5日間保存した後に、再度テストした。保存後に得られた結果も下記表4に示す。

表 3

処 方	GOD/ シリカ試薬 (g)	Pt炭素 試薬(g)	炭素/GOD -シリカの比	スポット1個当り コーティング溶液 ( $\mu$ l)
1 (C/Si=1)	0.105	0.110	1.05	0.4
2 (C/Si=2)	0.103	0.209	2.03	0.4
3 (C/Si=3.5)	0.117	0.413	3.53	0.4

表 4

0日目の結果

5日目の結果

処 方	過酸化物反応 (nA/mM)	グルコース反応 (nA/mM)	過酸化物反応 (nA/mM)	グルコース反応 (nA/mM)
1 (C/Si=1)	18.068	868	11.045	913
2 (C/Si=2)	19.136	766	14.320	886
3 (C/Si=3.5)	22.071	426	17.945	534

データは、実施例2と比較し、過酸化物反応は10倍、グルコース反応は2-3倍となり、電極の安定性も改善されたことを示している。データはまた、許容

できるグルコース反応を維持しながら、白金担持炭素と酵素／シリカ比は変化させうることも示している。

#### 実施例4

##### グルコースオキシダーゼと濃厚化剤を使用した酵素電極の製造

本実施例は、酵素電極の反応に対する濃厚剤の作用を示している。また、電極の安定性および反応の直線性に対する酵素固定化法の作用も示している。濃厚剤（Acrysol SCT 200）を使用すると、より高い過酸化物反応を有し、電極ごとのばらつきの少ないコーティングが得られた。この理

由は明らかではないが、疎水性または親水性を持つ濃厚剤はコーティングへの溶媒の浸透を改善する可能性があると考ええる。次の三つの方法でGODを固層に接着させた。（1）カルボジイミド結合により白金担持炭素をGODに共有結合させること、（2）炭素にイオン結合させること、（3）実施例3に記載のようにシリカにイオン結合させること。

#### 材料

1. 10%白金を含有する白金担持Vulcan XC 72（カーボンブラック）
2. GOD
3. MPBS
4. PBS／EDTAバッファ（1mMエチレンジアミン四酢酸および0.1% Kathon CGを保存料として含有する、100mMリン酸ナトリウム、100mM NaCl、pH6.0）
5. MESバッファ（50mMモルホリノエタンスルホネート、pH5.0）
6. EDAC（3-エチル1-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）（Sigma Chemical社、米国ミ

ズーリ州セントルイスから市販）

7. Magnifloc 591C（American Cyanamid）
8. ピロメリト酸二無水物（1, 2, 4, 5-テトラカルボキシレート二無水塩

、Aldrich)

### 1. 共有結合法 (EDC法)

水4ml中にEDC80mgを含有する溶液を、白金担持炭素の懸濁液 (MESバッファ40ml中1000mg)に加えて、混合物を形成した。直ちに、混合物にGOD (200mg)を加え、混合物を室温で一晩 (約12時間)混合した。一晩混合した後、過剰な液体を混合物から除去した。炭素/GOD混合物はPBS/EDTAバッファで1回洗ってから、種々の結合試薬に添加した。

### 2. PMA-GOD炭素/Quat結合法

GOD (200mg)をMPBSバッファ20mlに溶解し、溶液を形成した。調製したばかりのピロメリト酸二無水物の懸濁液 (水1ml中20mg) 1mlを混合物に加えて、反応混合物を形成した。室温に約10分間置くと、混合物は濁った状態から透明になり、二無水物アシル化反応が完了

したことを示した。反応終了後、反応混合物を、上記のように約30秒間均質化してある白金担持炭素 (1000mg)、Magnifloc 591C (100mg) および水 (12.5ml) の懸濁液と合わせた。陰イオン性GODを加えると、陽イオン性炭素が凝集し、これを遠心分離により回収した。次に、炭素/GOD複合体をPBS/EDTAバッファで洗い、遠心分離して、洗浄液を除去した。

### 3. PMA-GODシリカ/Quat

上記のようにこのバイオポリマー/固相結合手順に使用する方法是、実施例3に記載の方法と同じであるが、アセトン乾燥ステップが削除されている点だけが異なった。

## 樹脂

### 1. アクリル樹脂混合物A (濃厚剤なし、不揮発性固体分 38.5%)

成分	重量%
Joncryl 537 アクリルエマルジョン	68.4
フタル酸ジブチル	7.0

水酸化ナトリウム (3%溶液)	8.7
2-エトキシエタノール	20.6

## 2. アクリル樹脂混合物B (濃厚剤あり、Acrysol)

<u>成 分</u>	<u>重 量 %</u>
アクリル樹脂混合物A	76.9
Acrysol SCT2000 (Rohm and Hass、米国ペンシル バニア州フィラデルフィア)	23.1

### 電 極

下記の量で (表5) 固相GOD調製物を樹脂混合物と合わせ、次に混合し、分配し、実施例3に記載のようにテストした。

表 5

コーティング処方 (成分、mg)

成分 (湿潤)	EDC	EDC/ Acrysol	炭素/Quat	シリカ/Quat
GOD-EDC 炭素	235	235		
GOD-炭素/Quat			505	
GOD-シリカ/Quat				390
アクリル樹脂混合物 A	215		224	
アクリル樹脂混合物 B		217		433
水	552	555	755	780
白金担持炭素				230

グルコース水溶液 (0.5 mMおよび10 mM) を使用し、電極を製造直後および45℃で11日間、湿潤条件で保存後にテストした。減衰データを下記表6に示す。

表 6

1日目のデータ				11日目のデータ		
電 極	傾斜 (nA/mM)	Y-int (nA)	R	傾斜 (nA/mM)	Y-int (nA)	R (mM)
EDC-炭素	116	2	0.9997	72	8	0.9893
EDC-炭素/Acrysol	605	27	0.9980	168	20	0.9855
炭素/Quat	886	196	0.9535	322	152	0.8183
シリカ/Quat/Acrysol	885	27	0.9991	593	67	0.9876

表6に示す結果は、GODを炭素またはシリカにイオン結合させたときに、グルコース反応が特に高いことを示している。シリカに結合した酵素も、熱処理後でも、シグナル、直線性および安定性がよく調和していた。

#### 実施例5

##### 酵素結合剤としての陽イオン性シリカの製造

本実施例は、薫蒸シリカおよび可溶性シリカがある種の市販の四級ポリマーを吸着して、大量の陰イオン性酵素を吸着する

物質を形成することを示している。陰イオン性酵素として、本明細書ではグルコースオキシダーゼおよびピロメリト酸で修飾されたコレステロールオキシダーゼを例示している。

#### 材料

1. GOD
2. コレステロールオキシダーゼ (Norcadia erythropolis, Boehringer)
3. MPBS
4. PBS/EDTA
5. Snowtex UP、可溶性コロイド様シリカ20%溶液
6. 薫蒸シリカ (0.007 $\mu$ , Sigma)

7. Gafquatポリマー (GAF社、米国ニュージャージー州ウェイン)
8. Magniflocポリマー491C-496Cシリーズのポリアクリルアミド四級ポリマー (American Cyanamid)
9. Magniflocポリマー567C-591Cシリーズの四級アミンポリマー (American Cyanamid

社)

10. Merquat-100 (Calgon社、米国ペンシルバニア州ピッツバーグ)
11. Corcat P18ポリエチレンイミン (Cordova Chemical社、米国ミシガン州)
12. UCareポリマー、1%w/vのヒドロキシエチルセルロース四級ポリマー (Amerchol社、米国ニュージャージー州エジソン)

#### 手順

表7に示すポリマーの水溶液（濃度10-40mg/ml）を可溶性シリカまたは薰蒸シリカ（約0.5-2mgポリマー/mgシリカ）と混合し、得られた沈殿シリカ懸濁液を水で3回洗い、過剰なポリマーを除去した。シリカ1mg当たりGODを約1mg加えて、得られたシリカ/ポリマー複合体をバイオポリマー結合親和性についてテストした。洗浄ステップ後、複合体へのGODの吸着を可視的に測定した。複合体による黄色があれば、結合の結果が陽性であるとする。種々のポリマーに関する結合の結果を表7に示す。

表 7

## GOD/ シリカ結合

	ポリマー名	化学特性	可溶性	薫蒸
1.	Gafquat 734	四級化したビニルピロリドン	+	+
2.	Gafquat 755	四級化したビニルピロリドン	-	+/-
3.	Gafquat 755N	四級化したビニルピロリドン	+	+/-
4.	Magnifloc 491C	高分子量/軽度荷電	-	-
5.	Magnifloc 492C	高分子量/中等度荷電	-	-
6.	Magnifloc 494C	高分子量/高度荷電	-	-
7.	Magnifloc 496C	高分子量/非常に高度荷電	-	-
8.	Magnifloc 567C	低分子量/高度荷電	-	+
9.	Magnifloc 572C	非常に低分子量	-	-
10.	Magnifloc 577C	中分子量	-	+/-
11.	Magnifloc 579C	高度荷電	-	-
12.	Magnifloc 581C	高分子量	-	+
13.	Magnifloc 591C	高分子量	+	++
14.	Merquat 100	高分子量ポリ四級化	+	++
15.	Coreat P18	高分子量ポリエチレンイミン	+	++
16.	U-Care JR 125	高度荷電	-	+
17.	U-Care JR 400	高度荷電	-	+
18.	U-Care JR 30M	高度荷電	-	-
19.	U-Care LR 30M	中等度荷電	-	-
20.	U-Care LR 400	中等度荷電	-	-

表7に示す結果に基づき、薫蒸シリカ上のポリマー1、8、12、13、14、15、16および17を、ピロメリト酸（PMA）で誘導体化したコレステロールオキシダーゼ（ChOD）に対する結合親和性についてテストした。PMA/ChODは、グルコースオキシダーゼについて実施例4に述べたように、調製した。しかし、未反応のPMAを除去するた

めに、Sephadex<sup>®</sup> G-25カラム（Pharmacia

i a、スウェーデン、ウプサラから市販)でPMA/ChODを脱塩する手順を補った。

このように製造したPMA/ChOD (0.75 mg) を、ポリマーに結合しているシリカ0.78 mgを含有するPBSの溶液に加えた。得られた溶液を常に攪拌しながら室温で15分間インキュベートした。インキュベーション後、固相を遠心分離し、洗浄して未結合の酵素を除去してから、PBS/EDTAバッファ1 mlに再度懸濁させた。微細に分割した固相の酵素を適当に希釈し、ChOD活性を定量し、可溶性PMA/ChOD標準物質と比較した。ポリマー16および17は可視的にPMA/ChODの結合しているように思われなかったため、テストしなかった。酵素活性は、Abbott

V I S I O N<sup>®</sup> 分析器 (データ測定の際に反応混合物を混合で

きる遠心分離器付き分光光度計分析器、本出願人から市販)で過酸化水素結合比色検定で色の変化率として測定した。この実験で得られた結果を表8に示す。

表8は、室温で3日間乾燥させ、再構成し酵素結合固相のアリコートについて、保持された活性の量を測定した結果も示している。

表 8

修飾ポリマー	結合したPMA-ChOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	結合した活性PMA-ChOD (mg) /シリカ (mg)	乾燥後の PMA ChOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	保持された活性PMA-ChOD (mg) /シリカ (mg)
1	146	0.19	90	0.11
8	260	0.33	201	0.26
12	352	0.45	187	0.24
13	310	0.40	192	0.25
14	401	0.51	124	0.16
15	234	0.30	115	0.15

このデータは、処理したシリカはすべて酵素に対する高い結合能を有し、使用



したポリマーに応じて、結合能および乾燥後の活性の保持に2-3倍の差があることを示している。

### 実施例 6

#### 薫蒸シリカに共有結合したコレステロールオキシダーゼを使用した酵素電極の製造

本実施例は、アミノ化した薫蒸シリカにコレステロールオキシダーゼ (ChOD) を共有結合させる方法を示す。固定化したChODをコーティング処方に混合し、実施例1に示したように電流電極の方式でテストした。

#### 材料

1. コレステロールオキシダーゼ
2. MPBS (pH 7.5)
3. MESバッファ (pH 6.0)
4. 薫蒸シリカ
5. アミノプロピルトリエトキシシラン (A3648、Sigma)
6. Magnifloc 591C四級アミンポリマー
7. 3-エチル 1-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボ

#### ジイミド (EDAC)

8. トリニトロベンゼンスルホネート (Sigma)
9. ピロメリト酸二無水塩

#### 手順

薫蒸シリカ (1.0 g) をアミノプロピルトリエトキシシラン (ATS) の20%水溶液10mlと共に攪拌し、6NのHClでpHを3.28に調整し、反応混合物を形成した。反応混合物を水浴で1時間70℃に加熱し、水で2回洗い、MPBSバッファに再懸濁し、湿潤スラリーとして保存した。トリニトロベンゼンスルホネートと反応させたときのオレンジ色の存在によりアミンの存在を実証した。

ChODのピロメリト酸 (PMA) 誘導体を実施例5に

記載のように作製し、Sephadex<sup>®</sup> G-25カラムで脱塩し、Amicon<sup>®</sup> Centriprep 30濃縮器

(Amicon社、米国マサチューセッツ州ベヴァリーから市販)を使用して5.0mg/mlまで濃縮した。次のように酵素をアミノ化シリカに共有結合させた。アミノ化蒸着シリカ(湿潤状態で250mgの乾燥シリカに相当)をMESバッファで洗い、PMA-ChOD(MESバッファ10ml中酵素

50mg)の溶液に加えた。EDAC(20mg)を溶液に加え、次に溶液を攪拌しながら一晩(約12時間)インキュベートした。インキュベートした後、このように形成されたシリカ/ChOD複合体をMPBSバッファで洗い、4℃でバッファ中に保存した。複合体の活性は0.075mg活性酵素/mgシリカであった。

下記の樹脂処方を使用して実施例1と同様に電極を作製した。

アクリル樹脂混合物C(不揮発性の固体分55.9%)

成分	重量%
Joncryl 537 アクリルエマルジョン	36.1
フタル酸ジブチル	39.3
水酸化アンモニウム(1.5N溶液)	1.0
2-エトキシエタノール	23.6

本実施例に使用したコーティング処方は以下の成分を含んだ。

成分	量
PMA-ChOD/シリカ	384mg*
白金担持炭素	30mg
アクリル樹脂混合物C	130mg
蒸留水	456mg

\* この重量は蒸留水で1回洗い、遠心分離した後の複合体の湿潤重量に基づく。

四つの電極を作製し、100mMリン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウ

ム、1 mM EDTA、0.75%デオキシコール酸含有0.05% Kathon CGを含むバッファ中500  $\mu$ Mのコレステロール溶液中で、実施例1に上記のようにテストした。得られた電流反応は $323 \pm 28 \text{ nA} / 500 \mu\text{M}$ であった。

#### 実施例7

##### 消泡剤および安定剤を使用したグルタミン酸オキシダーゼ電極

本実施例は、濃厚剤Acrysol 275との混合中に生じる気泡を減少させるための樹脂処方中への消泡剤の使用を示す。下記の処方を使用すると、コーティング処方の消泡に要する時間が一晩から2時間未満に短縮された。

この処方はコーティング溶液中に可溶性二糖類、トレハロース (Sigma) も含んでいる。この物質が存在することにより、安定剤を添加していないコーティングと比較し、電極の乾燥安定性および正味シグナルがいずれも上昇した。

##### 材料および手順

実施例5に記載の手順を使用して、グルタミン酸オキシダー

ゼ (ヤマサ醤油株式会社、日本、東京から市販) を、無水ピロメリト酸で誘導体化し、精製した。次に、実施例6に記載のカルボジイミド法を使用して、PMAグルタミン酸オキシダーゼをアミノ誘導体化した薰蒸シリカに共有結合させ、湿潤状態で保存した。この湿潤状態の固定化グルタミン酸オキシダーゼの固形分は11%であり、シリカ1 mg当たり0.16 mgの活性酵素を含有していた。

白金担持炭素 (10%白金) をMPBSバッファで均質化し、蒸留水で3回洗い、遠心分離し、湿潤状態で保存した。湿潤状態の白金担持炭素の固形分は15%であった。

消泡剤を含む樹脂処方は以下のものを含有していた。

<u>アクリル樹脂混合物D 成分</u>	<u>重量%</u>
Joncryl 537アクリルエマルジョン	46.3
水酸化アンモニウム (1.5 N)	6.4
フタル酸ジブチル* (Fluka Chemical)	5.1
2-エトキシエタノール*	15.0

Surfynol 104H (Air Products)	1.9
Surfynol 695 (Air Products)	3.6
Acrysol 275 (Rohm & Haas)	21.8

\* フタル酸ジブチルは2-エトキシエタノールに溶解した後、アクリルエマルジョンに加えた。

コーティング溶液は以下の処方を使用して、実施例2に記載のように製造した。

成分	mg
PMAグルタミン酸オキシダーゼ-シリカ (湿潤)	206
白金担持炭素 (湿潤)	151
アクリル樹脂混合物D	140
トレハロース (水中0.085M)	502

コーティング溶液0.8 $\mu$ lを使用し、乾燥した室温環境で1週間、電極を硬化させて、実施例1に記載のように電極を作製した。次に、電極を37℃で7日間連続的に湿潤状態で使用してテストした。2時間毎に、バッファおよび希釈したウシ血漿 (血漿1部+MPBSバッファ3部、pH6.5) 中のグルタミン酸反応を実施例1に記載のように測定した。グルタミン酸反応の直線性をこの安定性試験の前後に測定し、下記表9に示す。この電極は37℃で7日間使用した後、最初の反応の40%を保持し、グルタミン酸に対する反応の直線性は維持された。

表 9

グルタミン酸 (mM)	正味nA (安定性試験前)	正味nA (安定性試験後)
0	0	0
0.025	146	51
0.050	255	97
0.100	480	182
0.150	654	289
0.200	841	354
0.250	1089	438
傾 斜	4.19	1.75
I n t	31.2	17.3
R <sup>2</sup>	0.997	0.997

電極を乾燥させ、37℃で5週間保存して処理した。熱処理後、電極をテストしたところ、電極反応（平均4電極スポット）は1033nA/250μMグルタミン酸で、熱ストレス前の1089nAと比較しても5%の損失に過ぎなかった。

#### 実施例 8

##### 過酸化水素触媒として金属ポルフィリンを使用した電極の製造

本実施例では、過酸化水素酸化触媒としての金属ポルフィリ

ンの使用を記述する。コーティング溶液中に白金担持炭素（白金10%）を使用する代わりに、金属ポルフィリンで処理した未白金担持活性炭素を使用した。さらに、固相に結合した酵素の代わりに、薰蒸シリカに共有結合したウシ血清アルブミン（BSA）をコーティングに混合した。

実施例7の手順に従って電極を作製した。

#### 材料

1. 白金を含まないVulcan XC 72R (カーボンブラック) (Cabot Industries) 米国マサチューセッツ州ウォールサム)
2. プロトポルフィリンIXジメチルエステル (Sigma)
3. 塩化コバルト (Sigma)
4. ウシ血清アルブミン (Sigma)
5. 薫蒸シリカ
6. アミノプロピルトリエトキシシラン
7. 3-エチル 1-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド
8. MESバッファ (pH 5.5)
9. MPBSバッファ (pH 7.5)

#### 手順

100mlの丸底フラスコでN,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 25.0mlを還流した後、プロトポルフィリンIXジメチルエステル200mgをフラスコに加えた。ポルフィリンが溶解するまで、攪拌棒で混合物を攪拌した。次に、塩化コバルト210mgをフラスコに加え、混合物を10分間還流した後、フラスコを熱源から離れた。反応混合物から過剰な溶媒を蒸発させ、反応混合物を250mLのエrlenmeyerフラスコに移し、氷水125mlを加えた。次に、フラスコを氷浴中に約20分間置き、得られた固体のコバルトプロトポルフィリン (CoPP) を濾過して回収し、一晩風乾させた。CoPPの溶液 (クロロホルム0.75ml中15.4mg) を500mgの均質化し、MPBSで洗浄した炭素に加えた。反応混合物を30分間攪拌してから、炭素混合物を遠心分離し、上清を捨てた。炭素を蒸留水で3回洗った。

実施例6のように薫蒸シリカをアミノプロピルトリエトキシシランでアミノ化し、BSAを下記のようにアミノ化シリカに共有結合させた。アミノ化薫蒸シリカ (湿潤状態で乾燥シリカ250mgに相当) をMESバッファで洗い、BSAの溶液

(MESバッファ10.0ml中51.0mg) に加えた。EDAC (20mg

)を溶液に加え、次に、一晚攪拌した。次に、シリカ／BSA複合体をMPBSバッファで洗った。

以下の処方を使用し、実施例7に記載のようにコーティング溶液を調製した。

成 分	mg
BSA-シラン (湿潤)	103
コバルトプロトポルフィリン (CoPP) で修飾した炭素 (湿潤)	76
アクリル樹脂混合物D	70
トレハロース (水中0.085M)	251

コーティング溶液0.8 $\mu$ lを使用し、実施例3のように電極を作製した。比較のために、上記の成分を使用して、CoPPで修飾した炭素の代わりに10%の白金担持炭素を含有するコーティング溶液を調製し、電極の作製に使用した。白金担持炭素はCoPP修飾炭素と同じ方法で、クロロホルムと共にインキュベートした。各型の二つの電極を、種々の電位で、100mM過酸化水素溶液を使用して電気化学的反応について

テストした。表10に示すデータは、炭素上のコバルトプロトポルフィリンは炭素上の白金と同様の方法で過酸化水素酸化を触媒することを示している。

表 10

負荷電位 (mV)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> に対するCoPP修飾炭素電極の反応 (nA)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> に対する白金担持炭素電極の反応 (nA)
350	1039	1487
250	416	1012
200	152	611
150	18	179

【図1】

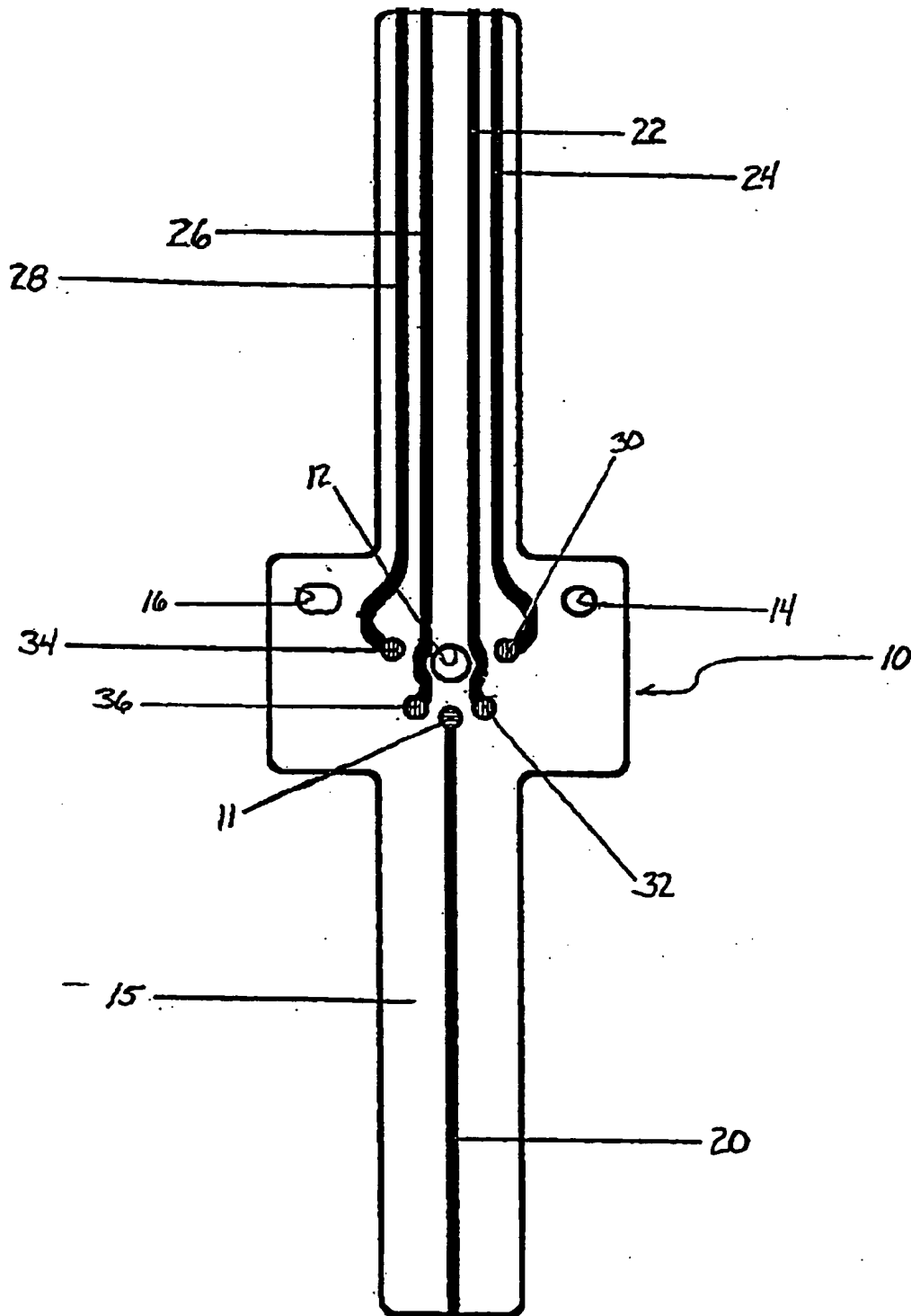


Figure 1



【図2】

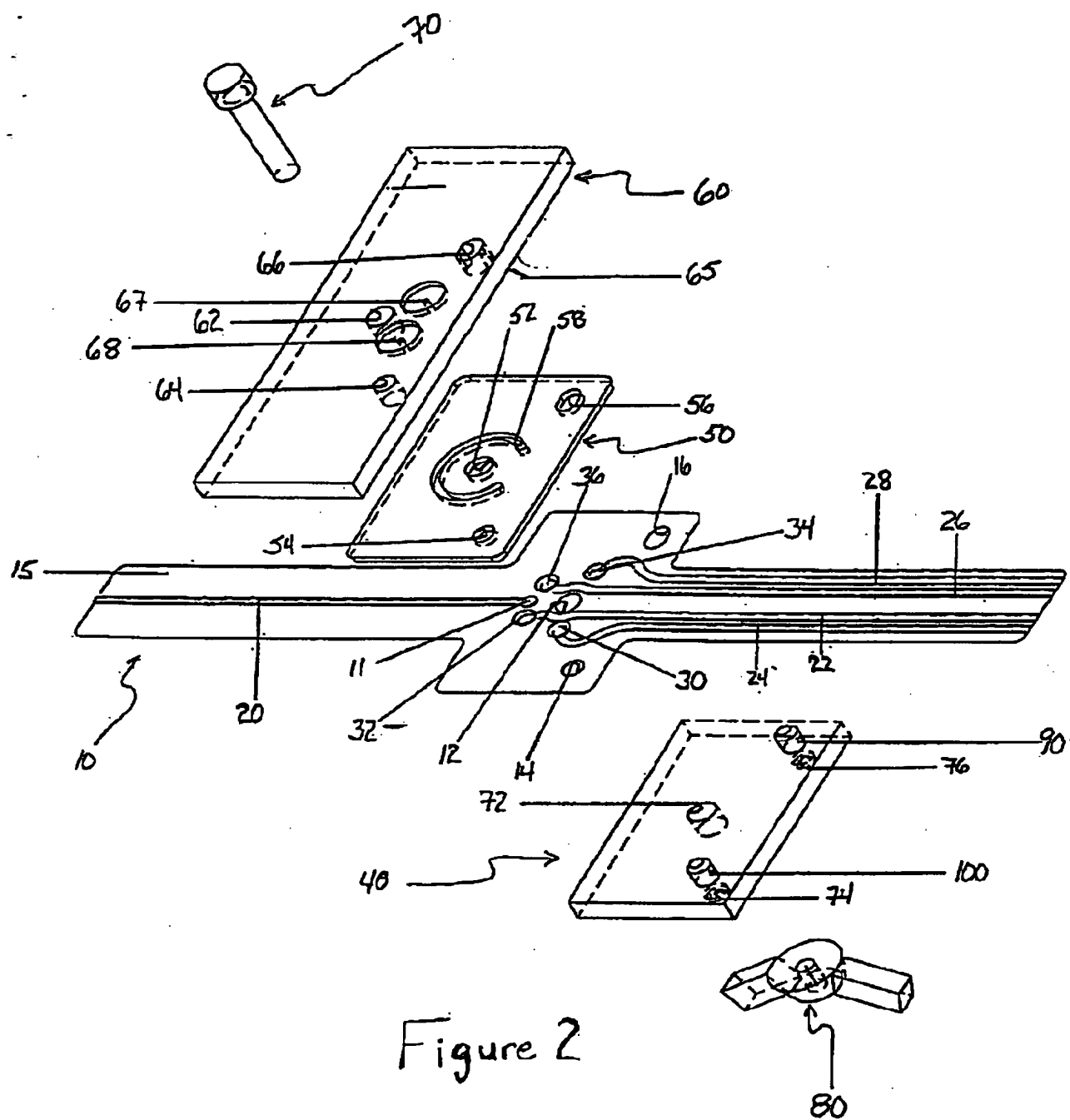


Figure 2

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/US 95/01605
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 G01N33/543 G01N33/545		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13 no. 351 (P-912) [3699] ,7 August 1989 & JP,A,01 112158 (TOKUYAMA SODA COMPANY) 28 April 1989, see abstract	1-29
Y	US,A,4 230 683 (R.H. DECKER ET AL.) 28 October 1990 cited in the application see column 2, line 20 - line 33	1-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  8 June 1995		Date of mailing of the international search report  22.06.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Van Bohemen, C

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

information on patent family members

International Application No  
**PCT/US 95/01605**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<b>US-A-4230683</b>	<b>28-10-80</b>	<b>NONE</b>	

---

フロントページの続き

- (72)発明者 ブラケット, ジョン・エム  
アメリカ合衆国、ウイスコンシン・53142、  
ケノーシャ、ワンハンドレッドサードイシ  
ツクスス・アベニュー・10011
- (72)発明者 ボツジズ, シエイラ・エイ  
アメリカ合衆国、イリノイ・60030、グレ  
イスレイク、グリーンツリー・ロード・  
17836
- (72)発明者 シュルツ, ステイブン・ジー  
アメリカ合衆国、イリノイ・60096、ウイ  
ンスロップ・ハーバー、フアンダーバー  
ク・ドライブ・2204